

Available online at: www.mikoina.or.id**Jurnal Mikologi Indonesia**

ISSN: 2579-8766

Online

Penapisan Isolat Khamir Oleaginous dari Nektar Bunga dan Madu Hutan

Screening of Oleaginous Yeast Isolates from Flower Nectar and Wild Honey

Anjani KD¹, Ilmi M¹¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta, 55281

Anjani KD, Ilmi M. 2018. Penapisan Isolat Khamir Oleagonius dari Nektar Bunga dan Madu Hutan. Jurnal Mikologi Indonesia 2(2), 99–111

Abstrak

Khamir oleaginous mampu mengakumulasi lipid lebih dari 15% dari berat kering selnya. Pada kondisi nitrogen yang terbatas, khamir tersebut mampu mengakumulasi lipid hingga 70%. Lipid yang dihasilkan mengandung asam lemak seperti palmitat, oleat, dan linoleat, sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi biodiesel. Khamir oleaginous umumnya hidup di lingkungan dengan konsentrasi karbon yang tinggi, antara lain nektar bunga dan madu. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan penapisan khamir oleaginous yang diisolasi dari nektar bunga dan madu hutan. Sampel nektar bunga diambil dari Kebun Raya Baturraden, Purwokerto, dan tempat pembibitan bunga di Kaliurang, Yogyakarta. Sedangkan sampel madu hutan diambil dari 11 kabupaten di Sulawesi. Uji kualitatif dilakukan dengan teknik pewarnaan Sudan III dan uji kuantitatif dilakukan dengan mengukur berat lipid per berat kering biomasnya. Penelitian menghasilkan 6 isolat khamir oleaginous dari 47 isolat: PG12.2 (17,88%), PG12.3 (17,13%), PG5.4 (18,25%), AP1 (19,07%), PM2.1 (17,55%), dan PM3.2 (18,56%). Profil pertumbuhan isolat AP 1 menunjukkan bahwa kandungan lipid yang diproduksi masih menunjukkan peningkatan setelah penumbuhan selama 70 jam.

Kata kunci – khamir – lipid – madu – nektar bunga – oleaginous

Abstract

Oleaginous yeasts are capable to accumulate intracellular lipids more than 15% of their dry weight cell. In a limited nitrogen condition, the yeasts are capable to accumulate lipid up to 70%. Lipid from the oleaginous yeasts is potential for biodiesel production due to contain fatty acids such as palmitate, oleate, and linoleate. The oleaginous yeast can be found in high-carbon environments, such as flower's nectar and honey. The objective of this study was to screen the oleaginous yeast isolates from the flower's nectar and wild honey. Flower's nectar samples were obtained from Baturraden Botanical Garden, Purwokerto, and a flower nursery in Kaliurang, Yogyakarta. The wild honey samples were obtained from 11 districts in Sulawesi. Qualitative assay was done using Sudan III dye method and quantitative assay was done by measuring the lipid weight per dry weight of the biomass. From a total 47 isolates, six isolates belong to oleaginous yeast, viz, PG 12.2 (17.88%), PG 12.3 (17.13%),

PG 5.4 (18.25%), AP 1 (19.07%), PM 2.1 (17.55%) and PM 3.2 (18, 56%). Growth profile of isolate AP 1 shows that the lipid content in the cell is still increasing after 70 hours.

Keywords – flower nectar – honey – lipid –oleaginous – yeast

Pendahuluan

Khamir merupakan mikroorganisme eukariotik uniseluler yang umumnya hidup sebagai saprofit atau parasit (Schneider 2004) dan bereproduksi secara asexual dengan membentuk *budding* atau *fussion* serta bereproduksi secara seksual dengan membentuk spora (Hogg 2005). Khamir secara taksonomi termasuk ke dalam Kingdom Fungi dan termasuk ke dalam filum Ascomykota dan Basidiomycota (Kurtzman *et al.* 2006).

Kemampuan khamir dalam memproduksi dan menyimpan lipid secara intraseluler telah banyak dilaporkan, Beopoulos dan Nicaud (2012) melaporkan bahwa 30 dari 600 spesies khamir mampu mengakumulasi lipid (khamir oleaginous). Spesies-spesies tersebut termasuk ke dalam beberapa marga, di antaranya *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Lipomyces* dan *Yarrowia*. Khamir oleaginous tersebut dapat mengakumulasi lipid sebesar 40% dari biomasanya. Khamir yang termasuk ke dalam kelompok mikroorganisme oleaginous menurut Dyer *et al.* (2002) mampu mengakumulasi lipid hingga lebih dari 15% dari berat kering selnya. Namun dengan kondisi nutrisi yang terbatas khamir oleaginous mampu mengakumulasi lipid hingga 70% dari biomassa selnya (Kahr *et al.* 2015). Beberapa spesies khamir yang mampu memproduksi lipid diantaranya adalah *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Andriani *et al.* 2013), *Rhodospiridium toruloides*, dan *Lipomyces starkeyi* (Bonturi *et al.* 2015). Lipid yang dihasilkan oleh khamir mengandung asam lemak seperti palmitat, oleat, dan linoleat (Andriani *et al.* 2013). Kandungan tersebut menjadikan lipid yang dihasilkan oleh khamir berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi biodiesel.

Produksi biodiesel pada awalnya dilakukan dengan memanfaatkan minyak dari sayur-sayuran, hewan, jagung, dan produk pertanian lainnya. Pada awalnya pemanfaatan produk pertanian tersebut sebagai bahan baku biodiesel memberikan dampak yang sangat positif terhadap lingkungan karena mampu mengurangi emisi dari polusi, namun timbul persoalan baru karena bahan yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel sebagian besar merupakan bahan pangan untuk konsumsi sehingga hal ini akan menyebabkan persaingan bahan baku tersebut (Naik *et al.* 2010). Oleh sebab itu, dibutuhkan bahan baku pengganti dalam produksi biodiesel, salah satunya dengan memanfaatkan mikroorganisme seperti alga, khamir atau kapang (Carere *et al.* 2008).

Produksi lipid dari khamir sebagai bahan baku biodiesel memiliki beberapa keunggulan, diantaranya adalah: khamir merupakan mikroorganisme yang terdapat dalam jumlah yang melimpah; teknik budidayanya sederhana; biaya produksi yang rendah; mampu memproduksi lipid secara terus menerus; memiliki komposisi lipid yang lebih sesuai untuk produksi biodiesel dibandingkan bakteri dan kapang; serta memiliki waktu kultivasi yang lebih pendek (Bonturi *et al.* 2015, Kahr *et al.* 2015).

Khamir penghasil lipid umumnya hidup di lingkungan dengan konsentrasi karbon yang tinggi (Lee & Chen, 2016), antara lain lingkungan yang mengandung kadar gula yang tinggi seperti nektar bunga dan madu. Konsentrasi gula yang terdapat didalam nektar bunga mencapai 29 % (Perret *et al.* 2001), sedangkan yang terdapat pada madu mencapai 60% (Man & Reuter 2015).

Indonesia merupakan negara yang memiliki biodiversitas flora dan fauna yang melimpah, salah satunya adalah memiliki keragaman jenis bunga dan spesies lebah yang tinggi. Keragaman tersebut menyebabkan banyaknya jenis nektar dan madu yang berpotensi

menjadi habitat bagi khamir penghasil lipid. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan penapisan khamir penghasil lipid yang diisolasi dari nektar bunga dan madu hutan.

Metode Penelitian

Sample penelitian

Nektar bunga diambil dari Kebun Raya Baturraden, Purwokerto, dan pembibitan bunga di Kaliurang, Yogyakarta. Madu hutan (terdiri atas 11 sampel madu yaitu Morowali, Toli, Sigi, Luwuk, Poso, Ampana, Banggai Kepulauan, Parigi-Moutong, Ogoamas, Kasimbar dan Balaesang merupakan koleksi Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, UGM yang diambil dari Sulawesi pada tahun 2015. Sebagai kontrol positif faktor koreksi warna dengan teknik pewarnaan Sudan III digunakan isolat *Candida orthosilopsis* INACC 302 yang didapat dari *Indonesian Culture Collection* (LIPI), sedangkan kontrol negatif digunakan isolat *Candida albicans* FNCC 001 yang didapat dari *Food and Nutrition Culture Collection*, UGM.

Pembuatan Medium BSEA (Bean Sprouts Extract Agar) dan NLM (Nitrogen Limited Medium)

Pembuatan medium BSEA dilakukan dengan menggunakan konsentrasi *bean sprouts* (tauge) 10%, gula 6% dan agar 1,5% (Saono *et al.* 1974). Komposisi medium NLM terdiri atas (g/L): glukosa (100), pepton (3), *yeast extract* (8) dan agar (20) dengan pH medium 5. Strain khamir dikulturkan dalam medium *nitrogen-limited* selama 48-72 jam pada suhu ruang (Jiru *et al.* 2016).

Pengambilan sampel bunga dan madu hutan

Pengambilan sampel bunga yang pertama dilakukan di Kebun Raya Baturraden dilakukan secara *random sampling*. Sampel bunga yang berasal dari Kebun Raya Baturraden terdiri dari 3 spesies bunga yaitu *Lycoris radiata*, *Vanda* sp., dan *Costus* sp. Bunga yang disimpandi dalam plastik *ziplock* dan diberi label jenis spesies, tanggal pengambilan dan lokasi pengambilan sampel. Sampel bunga dibawa ke laboratorium dalam *cool box* dan disimpan di dalam lemari pendingin untuk selanjutnya diambil sampel nektarnya.

Pengambilan sampel nektar bunga yang kedua dilakukan di daerah Kaliurang, Yogyakarta. Sampel bunga yang berasal dari Kaliurang terdiri atas 5 jenis bunga yaitu *Petunia* sp., *Torenia* sp., *Saintpaulia* sp., *Capsicum* sp., dan *Ochna* sp.. Pengambilan sampel nektar bunga dilakukan secara langsung ditempat sehingga metode pengambilan sampelnya berbeda dengan pengambilan sampel bunga di daerah Baturraden. Hal ini dikarenakan pada pengambilan sampel dari kebun raya Baturraden diperoleh isolat khamir yang jumlahnya sedikit, diduga disebabkan kondisi bunga yang sudah tidak segar. Sampel bunga yang dipilih berukuran besar untuk mempermudah proses pengambilan sampel, nektar diambil dengan *cotton bud* steril dan kemudian dimasukkan kedalam *microtube* dan yang telah diberi label.

Sampel madu hutan merupakan koleksi Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, UGM yang sebelumnya diambil dari Sulawesi pada tahun 2015. Terdapat 11 jenis sampel madu hutan yang diambil dari 11 kabupaten yang ada di daerah Sulawesi, yaitu Morowali, Toli, Sigi, Luwuk, Poso, Ampana, Banggai Kepulauan, Parigi-Moutong, Ogoamas, Kasimbar, dan Balaesang. Sampel madu dipindahkan dari wadah penyimpanan utama di Laboratorium Sistematika Tumbuhan ke wadah steril dengan bantuan pipet tetes, kemudian sampel madu disimpan didalam lemari pendingin untuk selanjutnya dilakukan proses isolasi.

Isolasi khamir dari sampel nektar bunga

Sampel nektar bunga yang berasal dari Kebun Raya Baturraden diisolasi menggunakan *cotton bud* steril, kemudian diinokulasikan menggunakan metode *streak plate* ke dalam medium BSEA secara aseptis dan diinkubasi selama 24-48 jam. Untuk sampel nektar bunga yang berasal dari Kaliurang, *cotton bud* yang mengandung sampel nektar yang berada didalam *microtube* diencerkan dengan larutan salin (NaCl) 0,9%, kemudian suspensi tersebut disebarkan di permukaan medium BSEA sehingga diperoleh isolat murni. Selanjutnya, dipastikan apakah isolat murni yang diperoleh merupakan isolat khamir atau bukan dengan pengamatan mikroskopis.

Isolasi khamir dari sampel madu hutan

Sebanyak 2 g dari masing-masing sampel madu hutan ditimbang dan ditambahkan ke dalam 2 mL akuades steril pada tabung reaksi, lalu dihomogenisasi dengan vortex. Selanjutnya sampel madu hutan yang telah diencerkan diambil sebanyak 0,2 mL dengan mikropipet dan diinokulasikan ke dalam petri berisi medium BSEA dengan cara menyebarkan di bagian permukaan agar (*spread plate*). Masing-masing sampel madu dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Inkubasi dilakukan selama 72-120 jam. Apabila ditemukan pertumbuhan yang menyebar (*spreader*), dilakukan pengenceran dengan konsentrasi sampel 0,2 hingga 0,1 g/mL. Selanjutnya dilakukan proses purifikasi. Penyimpanan isolat murni khamir dilakukan dalam medium miring BSEA dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 30°C.

Penapisan kemampuan khamir penghasil lipid

Dari hasil isolasi isolat yang diperoleh dari nektar bunga dan madu hutan kemudian dilakukan penapisan kemampuan khamir yang mampu menghasilkan lipid, yaitu dilakukan dengan uji analisis kualitatif menggunakan teknik pewarnaan Sudan III (Evans *et al.* 1985). Pertama-tama isolat khamir diinokulasikan secara *streak plate* ke dalam medium NLM agar selama 3-4 hari pada suhu 30°C hingga diameter koloni berukuran 2-3 mm. Selanjutnya isolat khamir yang tumbuh dipindahkan ke kertas whatman No. 1 (diameter 5 cm) dengan bantuan jarum ose, kemudian isolat khamir dalam kertas whatman dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 20 menit. Setelah 20 menit, kertas whatman berisi isolat khamir diletakkan ke dalam cawan petri yang telah berisi pewarna Sudan III (0,08% sudan III dalam 95% etanol) selama 20 menit. Kemudian pewarna dicuci dengan dimasukkan kedalam cawan petri yang berisi 95% etanol dan digoyangkan selama 3 menit. Kemudian diletakkan ke dalam cawan petri berisi 95% etanol selama 5 menit dan dibiarkan kering.

Kultivasi khamir dalam medium NLM (Nitrogen Limited Medium)

Isolat khamir yang memperoleh hasil positif (+++) pada uji kualitatif dengan teknik pewarnaan Sudan III kemudian dikultivasi ke dalam medium NLM yang terdiri atas (g/L): glukosa (100), pepton (3) dan *yeast extract* (8) dengan pH medium 5. Inokulum khamir diambil sebanyak 10% (v/v) dimasukkan kedalam erlenmeyer berukuran 250 mL yang berisi 100 mL medium. Strain khamir oleaginous dikulturkan dalam medium NLM selama 72 jam pada suhu ruang dan di-shaker pada kecepatan 220 rpm (Jiru *et al.* 2016).

Penentuan berat kering khamir

Isolat khamir kemudian ditentukan berat keringnya. Diambil sebanyak 35 ml isolat khamir, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya biomassa sel nya dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan 10 mL akuades dan

dikeringkan pada suhu 60 °C hingga berat nya konstan, sehingga berat kering isolat khamir dapat diketahui (Amir *et al.* 2015).

Penentuan presentase lipid pada khamir

Pengukuran presentase lipid didalam sel khamir dilakukan dengan cara mengekstraksi lipid yang terdapat didalam isolat khamir yang kemudian dikeringkan dan diukur beratnya. Pengukuran persentase lipid dilakukan dengan menggunakan metode Bligh and Dyer (1959). Metode ini dapat dilakukan untuk mengukur persentase lipid secara cepat. Diambil sebanyak 35 mL sampel isolat khamir yang akan diukur persentase kandungan lipidnya kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000rpm selama 10 menit. Setelah itu dicuci sebanyak 2 kali dengan menggunakan akuades sebanyak 10 mL. Ditambahkan 10 mL HCL 4 M dan *dishakker* selama dua jam. Selanjutnya ditambahkan dengan 10 ml kloroform dan metanol pada suhu ruang selama 2 jam. Lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000rpm selama 10 menit pada suhu ruang untuk memisahkan fase cair (*upper phase*) dan fase organik (*lower phase*). Selanjutnya fase organik yang mengandung lipid diambil dengan bantuan pipet tetes dan larutan tersebut dievaporasi atau diuapkan sehingga berat kering lipid dalam isolat khamir dapat ditentukan. Dan pengukuran kadar lipid pada masing- masing isolat khamir ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Persentase lipid (\%)} = \frac{\text{beratlipid (gr)}}{\text{beratkeringbiomassa (gr)}} \times 100$$

Pembuatan profil lipid

Pembuatan profil lipid dilakukan dengan cara mengkultivasi isolat khamir oleaginous dengan persentase lipid tertinggi kedalam medium NLM cair. Kemudian diukur berat kering khamir dan persentase lipid setiap 12 jam dari jam ke -0 hingga jam ke -72.

Karakterisasi makroskopis dan mikroskopis isolat khamir oleaginous

Isolat khamir yang termasuk kedalam kelompok khamir oleaginous selanjutnya dilakukan karakterisasi morfologi koloni (makroskopis) meliputi tekstur, warna koloni, permukaan koloni, elevasi dan margin. Serta dilakukan pengamatan mikroskopis meliputi bentuk sel.

Hasil

Isolat khamir dari nektar bunga dan madu hutan

Hasil isolasi khamir dari nektar bunga diperoleh sebanyak 20 isolat khamir sedangkan hasil isolasi khamir dari madu hutan diperoleh sebanyak 27 isolat khamir, sehingga diperoleh 47 isolat total khamir yang berhasil diisolasi dari nektar bunga dan madu hutan (Tabel 1).

Tabel 1 Isolat dari nektar bunga dan madu hutan

No.	Sumber	Jumlah	Kode
1.	Nektar bunga	20	BL 6.1; BL 6.22; BL 6.4; BL 7.1; BL 7.2; BL 8.21; BL 8.22; PG 1.1; PG 1.2; PG 1.3; PG 2.2; PG 4.3; PG 5.4; PG 5.5; PG 10.11; PG 10.12; PG 12.1; PG 12.2; PG 12.3; dan PG 12.4.

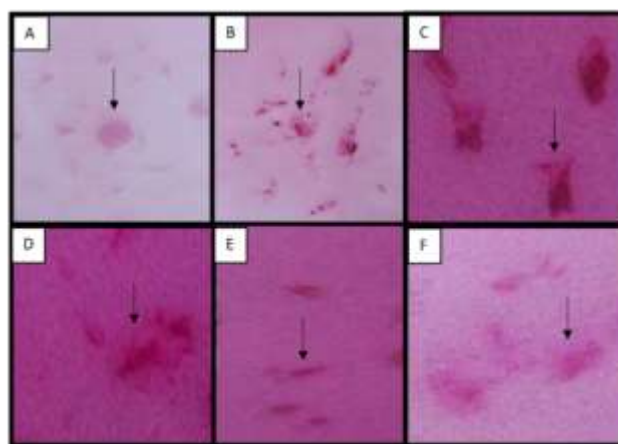
2.	Madu hutan	27	AP 1; AP 3; BK 1.1; BK 3.2; KS 1; KS 2; LW 1.1; LW 3.1; LW 3.2; MR 1.2; MR 2.2; MR 3.1; MR 3.2; OG 1; OG 2; PM 1.1; PM 2.1; PM 3.2; PS 1.1; PS 1.2.1; PS 3.2; SG 1.2; SG 3.1; SG 3.2; TL 1.1; TL 2.2 dan TL 3.2.
Total Isolat		47	

Keterangan: BL= nektar bunga dari kebun raya Baturaden; PG= nektar bunga dari Kaliurang; MR= madu dari Morowali; TL= madu dari Toli; SG= madu dari Sigi; LW= madu dari Luwuk; PS= madu dari Poso; AP= madu dari Ampaña; BK= madu dari Banggai Kepulauan; PM= madu dari Parigi-Moutong; OG= madu dari Ogoamas; KS= madu dari Kasimbar; ML= madu dari Balaesang

Uji kualitatif isolat khamir dari nektar bunga dan madu hutan

Uji kualitatif khamir oleaginous dilakukan menggunakan pewarnaan Sudan III, khamir *C. orthosilopsis* INACC 302 dan *C. albicans* FNCC 001 digunakan sebagai kontrol positif dan negatif. Hasil pengujian kualitatif isolat khamir kemudian diberi keterangan (+++) untuk isolat khamir yang warnanya sama dengan kontrol positif, (++) untuk isolat khamir yang warnanya mendekati kontrol positif, (+) untuk isolat khamir yang warnanya mendekati kontrol negatif dan (–) untuk isolat khamir yang warnanya sama dengan kontrol negatif (Gambar 1).

Berdasarkan hasil skrining kualitatif dapat diketahui bahwa terdapat sekitar 30% (6 dari 20 isolat) isolat khamir dari nektar bunga yang memperoleh hasil positif (+++). Dan terdapat sekitar 37,04% (10 dari 27 isolat) isolat khamir hasil isolasi dari madu hutan yang memperoleh hasil positif (+++) (Tabel 2).



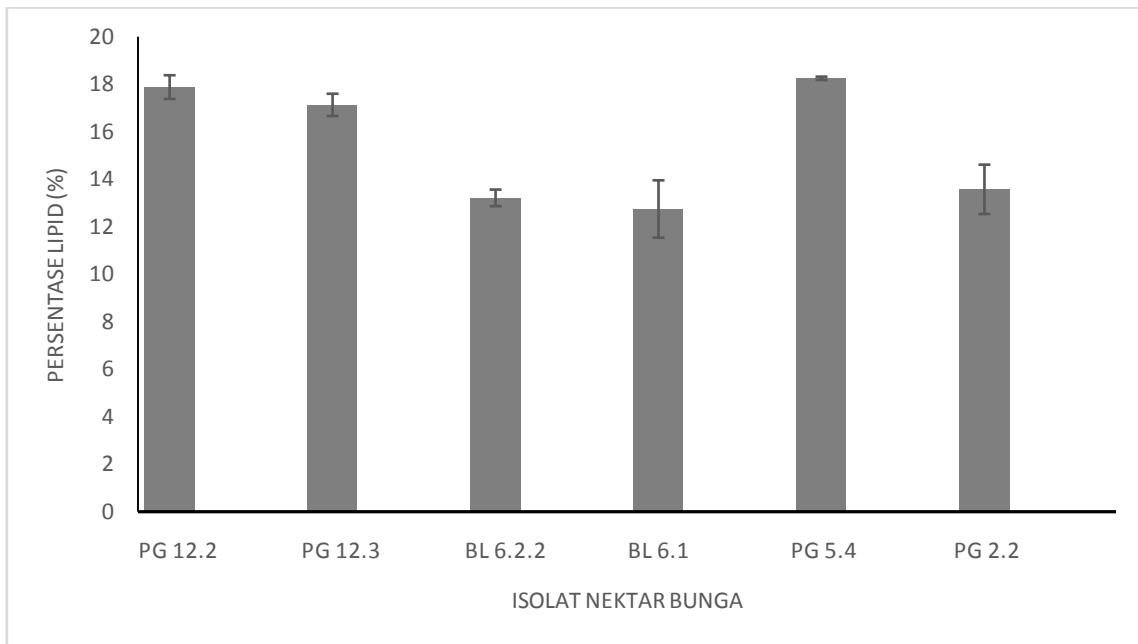
Gambar 1 Hasil uji skrining kualitatif khamir dengan pewarna sudan III: (A) Kontrol negatif (*Candida albicans* FNCC001); (B) Kontrol positif (*Candida orthosilopsis* INACC 302); (C) Hasil uji kualitatif (+++); (D) Hasil uji kualitatif (++); (E) Hasil uji kualitatif (+); dan (F) Hasil uji kualitatif (–). Tanda panah: noda sel khamir yang terwarnai (sumber: dokumentasi pribadi)

Uji kuantitatif isolat khamir dari nektar bunga dan madu hutan

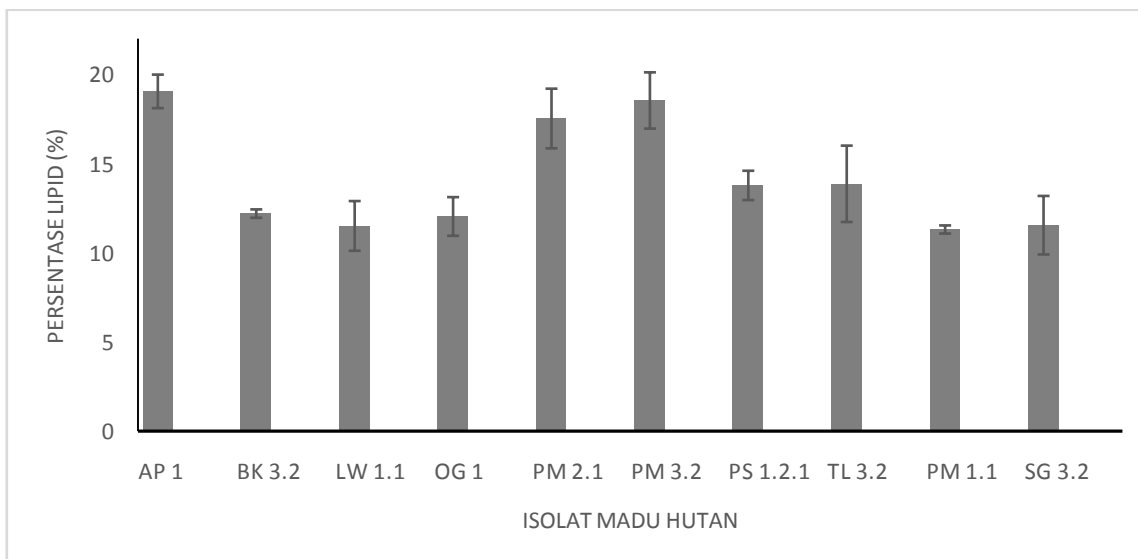
Berdasarkan dari hasil pengukuran lipid secara kuantitatif dapat diketahui persentase lipid tertinggi pada khamir hasil isolasi dari nektar bunga diperoleh isolat PG 5.4 dengan persentase lipid sebesar 18,25 %. Sedangkan persentase lipid terendah diperoleh isolat BL 6.1 dengan persentase lipid sebesar 12,74 % (Gambar 2). Persentase lipid tertinggi pada khamir hasil isolasi dari madu hutan diperoleh isolat AP 1 dengan persentase lipid sebesar 19,07 %. Sedangkan persentase lipid terendah diperoleh isolat PM 1.1 dengan persentase lipid sebesar 11,33 % (Gambar 3).

Tabel 2 Hasil uji positif (+++) skrining kualitatif lipid isolat khamir dari nektar bunga dan madu hutan

No.	Sumber isolat	Jumlah	Kode isolat
1.	Nektar bunga	6	PG 12.2; PG 12.3; BL 6.2.2; BL 6.1; PG 5.4 dan PG 2.2.
2.	Madu hutan	10	AP1; BK 3.2; LW 1.1; OG 1; PM 2.1; PM 3.2; PS 1.2.1; TL 3.2; PM 1.1 dan SG 3.2.



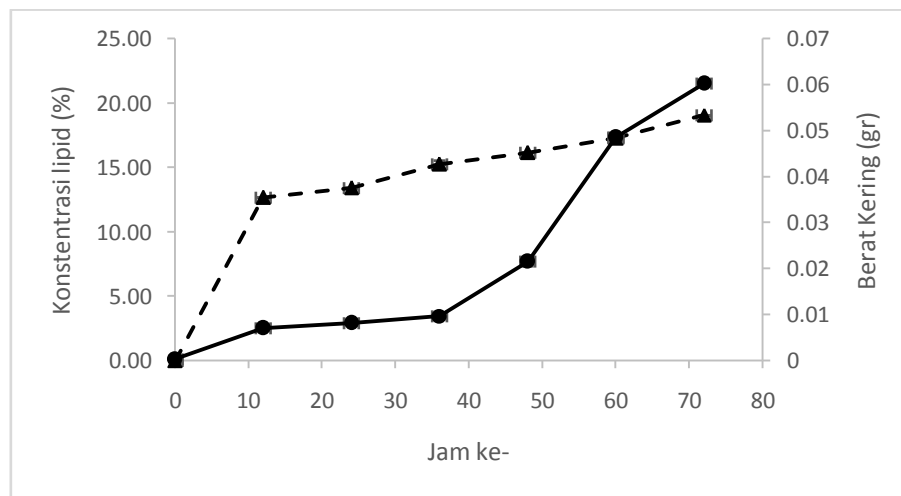
Gambar 2 Persentase lipid isolat khamir dari nektar bunga



Gambar 3 Persentase lipid isolat khamir dari madu hutan

Profil Produksi Lipid Isolat AP 1

Profil produksi lipid dilakukan terhadap isolat AP 1 sebab mampu menghasilkan lipid dengan persentase tertinggi (19,07%). Grafik berat kering dan persentase lipid pada isolat AP 1 menunjukkan peningkatan tiap 12 jam (Gambar 4). Pada jam ke-0 isolat AP 1 memiliki berat kering 0,00035 g dengan persentase lipid sebesar 0%. Pada jam ke-12 isolat AP 1 berat keringnya 0,0071 g dengan persentase lipid sebesar 12,68%. Kemudian pada jam ke-24 berat keringnya mengalami peningkatan menjadi 0,0082 g dengan persentase lipid sebesar 13,41%. Selanjutnya pada jam ke-36 berat keringnya mengalami peningkatan menjadi 0,0097 gr dengan persentase lipid sebesar 15,26%. Selanjutnya pada jam ke- 48 berat keringnya mengalami peningkatan menjadi 0,0216 g dengan persentase lipid sebesar 16,17%. Selanjutnya pada jam ke-60 berat keringnya mengalami peningkatan menjadi 0,0486 g dengan persentase lipid sebesar 17,28% dan pada jam ke-72 berat keringnya mengalami peningkatan menjadi 0,0603 g dengan persentase lipid sebesar 19,07%.



Gambar 4 Profil berat kering dan % lipid isolat AP 1. (▲): konsentrasi lipid, (●): berat kering (garis sebagai alat ilustratif)

Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Khamir Oleaginous

Karakterisasi makroskopis yang meliputi karakteristik morfologi koloni seperti tekstur, warna koloni, permukaan koloni, elevasi dan margin serta karakteristik mikroskopis yang meliputi bentuk sel dari keenam isolat khamir oleaginous diperoleh hasil seperti pada Tabel 3.

Berdasarkan dari Tabel 3 tersebut dapat diketahui keenam isolat khamir oleaginous memiliki tekstur *butyrous*. Keseluruhan isolat khamir oleaginous berwarna cream kecuali isolat PG 5.4 dan PM 2.1 yang berwarna *creamy brown*. Keseluruhan isolat khamir oleaginous memiliki permukaan koloni bertipe *dull* kecuali isolat PM 2.1 yang memiliki permukaan koloni bertipe *smooth*. Keseluruhan isolat khamir oleaginous memiliki elevasi bertipe *raised* dan margin bertipe *entire* kecuali isolat PG 12.2 dan PG 12.3 yang margin nya bertipe *entire with filament*. Dan isolat khamir oleaginous yang berasal dari nektar bunga (PG 12.2, PG 12.3 dan PG 5.4) memiliki bentuk sel bertipe *fusiform* sedangkan isolat khamir oleaginous yang berasal dari madu hutan (AP 1, PM 2.1 dan PM 3.2) memiliki bentuk sel bertipe *circular*.

Tabel 3 Karakteristik makroskopis dan mikroskopis isolat khamir oleaginous

No.	Karakteristik	Isolat Khamir Oleaginous
-----	---------------	--------------------------

	PG 12.2	PG 12.3	PG 5.4	AP 1	PM 2.1	PM 3.2
1. Morfologi Koloni						
Tekstur						
Butyrous	+	+	+	+	+	+
Warna koloni						
Cream	+	+	-	+	-	+
Creamy Brown	-	-	+	-	+	-
Permukaan koloni						
Dull	+	+	+	+	-	+
Smooth	-	-	-	-	+	-
Elevasi						
Raised	+	+	+	+	+	+
Margin						
Entire	-	-	+	+	+	+
Entire with filament	+	+	-	-	-	-
2. Morfologi sel						
Bentuk sel						
Fusiform	+	+	+	-	-	-
Circular	-	-	-	+	+	+

Pembahasan

Khamir penghasil lipid umumnya hidup dilingkungan dengan konsentrasi karbon yang tinggi (Lee & Chen 2016) karena lipid diproduksi oleh khamir ketika konsentrasi C lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi N (Jiru *et al.* 2016). Pada konsentrasi N yang lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi C nya akan menyebabkan isolat khamir berada dalam kondisi starvasi nitrogen sehingga pada kondisi tersebut menyebabkan isolat khamir merombak karbon yang ada didalam medium untuk menghasilkan energi, sehingga lipid sebagai cadangan energi didalam sel tidak digunakan dalam proses penghasilan energi dan menyebabkan akumulasi lipid didalam sel menjadi tinggi (Kolouchova *et al.* 2016). Oleh karena itu, pada penelitian ini isolat khamir yang berpotensi menghasilkan persentase lipid yang tinggi diisolasi dari madu hutan dan nektar bunga karena persentase kadar gula yang terdapat didalam nektar bunga mencapai 29 % (Perret *et al.* 2001) sedangkan persentase kadar gula yang terdapat pada madu hutan mencapai 60% (Man & Reute 2015). Sehingga diharapkan dalam persentase kadar gula yang tinggi tersebut terdapat pula isolat khamir yang mampu mengakumulasi lipid dalam jumlah yang tinggi.

Isolat khamir dari nektar bunga lebih sedikit jumlahnya yaitu 20 isolat dibandingkan isolat khamir dari madu hutan yaitu sebanyak 27 isolat, dikarenakan isolat khamir yang berasal dari nektar bunga setelah dilakukan seleksi lebih lanjut secara morfologi sel diperoleh hasil bahwa isolat tersebut termasuk ke dalam kelompok bakteri dan bukan khamir, selain itu juga dipengaruhi oleh kondisi cuaca, karena pada saat dilakukan pengambilan sampel dilapangan memasuki musim penghujan sehingga dimungkinkan mikrobia yang terdapat didalam bunga menjadi sedikit jumlahnya karena terbawa air hujan. Habitat khamir pada umumnya berada di permukaan tanaman, sehingga adanya hujan akan menyebabkan khamir tersebut mengalami *wash out* (Hamamoto *et al.* 2002).

Proses skrining atau penapisan tahap awal dengan menggunakan metode kualitatif Evans *et al.* (1985) yaitu dengan mengkulturkan isolat khamir didalam medium NLM yang mengandung 10% glukosa. Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan akumulasi lipid di dalam sel khamir dan untuk menyesuaikan lingkungan hidup khamir hasil isolasi agar dapat tumbuh dengan baik dan membentuk koloni. Selanjutnya dilakukan tahap pewarnaan dengan menggunakan pewarna Sudan III yang merupakan pewarna yang umum digunakan untuk mendeteksi adanya lipid dalam sampel, pewarna Sudan III merupakan *lysochrome* (pewarna lipid) yang memiliki struktur mirip dengan azobenzene (Patel *et al.* 2015). Sudan III akan

bereaksi dengan lipid dan membentuk kompleks warna merah menyala bila di dalam sampel positif terdapat adanya kandungan lipid. Dalam proses skrining kualitatif dengan teknik pewarnaan ini digunakan kontrol positif yaitu isolat khamir *Candida orthosilopsis* yang merupakan salah satu contoh khamir oleaginous yang mampu mengakumulasi lipid lebih dari 40% dari biomasanya (Kanti *et al.* 2013). Kontrol positif tersebut digunakan sebagai faktor koreksi warna dari hasil pewarnaan yang terbentuk, sehingga hasil pewarnaan dari masing-masing isolat selalu dibandingkan dengan kontrol positifnya. Pada uji kualitatif ini juga digunakan kontrol negatif yaitu isolat khamir *Candida albicans*, digunakan sebagai kontrol negatif karena isolat khamir ini hanya mampu mengakumulasi lipid sebanyak 5% dari berat keringnya (Mago & Khuller 1990). Sehingga diharapkan hasil skrining lipid secara kualitatif ini mampu menyeleksi isolat khamir yang mampu mengakumulasi lipid dengan jumlah persentase yang tinggi.

Khamir pada madu hutan sudah mampu beradaptasi dalam kondisi kadar gula yang tinggi, dan karbon gula tersebut digunakan dalam proses penghasilan energi sehingga jumlah lipid yang terakumulasi di dalam sel nya menjadi lebih banyak dan menyebabkan isolat khamir madu hutan terwarnai merah menyala (+++) saat dilakukan pewarnaan dengan Sudan III. Di lain pihak, isolat khamir dari nektar bunga memiliki persentase kadar gula yang lebih rendah, sehingga kadar lipid yang di dalam sel kemungkinan juga lebih rendah dibandingkan isolat khamir dari madu hutan.

Hasil uji kuantitatif lipid pada Gambar 2 dan 3 tersebut dapat diketahui bahwa persentase lipid pada khamir hasil isolasi dari nektar bunga dan madu hutan memiliki persentase lipid lebih dari 10%. Pada umumnya khamir hanya mampu mengakumulasi lipid sekitar 4% dari berat keringnya biomassa selnya (Schneiter 2004). Hal ini menandakan bahwa metode skrining tahap awal lipid secara kualitatif dapat digunakan sebagai metode skrining lipid khamir secara cepat dan tepat, terbukti dengan persentase lipid yang tinggi dari hasil uji kuantitatif lipid. Menurut Dyer *et al.* (2002) khamir yang termasuk kedalam kelompok mikroorganisme oleaginous mampu mengakumulasi lipid hingga lebih dari 15% dari berat kering selnya. Persentase lipid khamir pada madu hutan lebih tinggi dibandingkan nektar bunga. Hal ini didasari oleh penelitian Morita *et al* (2011) yang menyatakan bahwa khamir oleaginous seperti *Pseudozyma churashimaensis* berhasil diisolasi dari tebu yang ada di daerah Okinawa, Jepang. *Pseudozyma churashimaensis* mampu mengakumulasi lipid sebanyak 38,57% dari berat kering sel nya. Selain itu menurut Kolouchova *et al* (2016) khamir mampu tumbuh dan mengakumulasi lipid pada substrat yang mengandung konsentrasi karbon tinggi. Sehingga habitat madu hutan memenuhi syarat tersebut dan menyebabkan khamir oleaginous hasil isolasi dari madu hutan memiliki kandungan lipid yang tinggi.

Berdasarkan dari hasil uji kuantitatif lipid tersebut dapat diketahui bahwa pada khamir hasil isolasi dari nektar bunga terdapat 3 isolat khamir yang mampu mengakumulasi lipid lebih dari 15% diantaranya adalah isolat PG 12.2 (17,88%), PG 12.3 (17,13%) dan PG 5.4 (18,25%). Dan pada khamir hasil isolasi dari madu hutan juga terdapat 3 isolat khamir yang mampu mengakumulasi lipid lebih dari 15% diantaranya adalah isolat AP 1 (19,07%), PM 2.1 (17,55%) dan PM 3.2 (18,56%). Sehingga dari hasil uji kuantitatif lipid tersebut dapat diketahui bahwa terdapat 6 isolat khamir dari nektar bunga dan madu hutan yang termasuk ke dalam kelompok khamir oleaginous. Hasil yang diperoleh telah sesuai dengan teori karena menurut Lee & Chen (2016) khamir oleaginous atau kelompok khamir yang mampu mengakumulasi lipid dalam persentase tinggi umumnya hidup dilingkungan dengan konsentrasi karbon yang tinggi. Hal ini disebabkan karena habitat nektar bunga dan madu hutan memiliki kadar gula yang tinggi, nektar bunga memiliki persentase kadar gula yang mencapai 29% (Perret *et al.* 2001) sedangkan persentase kadar gula yang terdapat pada madu mencapai 60% (Man & Reuter 2015). Sehingga kondisi ini menyebabkan isolat khamir mampu mengakumulasi lipid dalam jumlah yang tinggi dan menyebabkan khamir yang

termasuk ke dalam kelompok khamir oleaginous dapat ditemukan di nektar bunga dan madu hutan. Dan dari hasil tersebut diketahui bahwa isolat khamir yang memiliki persentase lipid tertinggi merupakan isolat AP 1 (19,07%).

Profil lipid pada isolat AP 1 tersebut menunjukkan bahwa dari jam ke-0 hingga jam ke-36 berat kering biomassa khamir berada dalam fase lag yang ditandai dengan pertumbuhan khamir yang berjalan lambat karena isolat khamir masih beradaptasi dengan kondisi lingkungan hidupnya yang baru. Kemudian pada jam ke-36 hingga jam ke -72 isolat khamir berada dalam fase log atau eksponensial yang ditandai dengan peningkatan berat kering biomassa khamir yang sangat pesat (Beopoulos & Nicaud 2012). Sehingga dari data profil lipid isolat khamir tersebut dapat diketahui bahwa isolat khamir tersebut membutuhkan waktu inkubasi lebih dari 72 jam untuk memperoleh persentase lipid yang optimal.

Hal ini disebabkan karena akumulasi lipid tertinggi terjadi ketika isolat khamir berada dalam fase stasioner sedangkan dari hasil profil lipid selama 72 jam isolat khamir AP 1 masih berada dalam fase log sehingga dibutuhkan waktu inkubasi lebih dari 72 jam untuk mampu menunjukkan fase stasioner dari isolat AP 1 tersebut. Menurut Beopoulos dan Nicaud (2012), pada fase stasioner pertumbuhan khamir penghasil lipid melambadiduga karena habisnya nitrogen didalam medium. Kondisi ini menyebabkan khamir tersebut akan mengasimilasi sumber karbon yang tersisa, seperti glukosa dan gliserol, untuk digunakan dalam proses sintesis lipid.

Berdasarkan dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dari 47 isolat khamir hasil isolasi dari nektar bunga dan madu hutan terdapat 6 isolat khamir yang mampu mengakumulasi lipid dalam jumlah yang tinggi (> 15%) dari berat kering selnya dan termasuk kedalam kelompok khamir oleaginous yang terdiri atas PG 12.2 (17,88%), PG 12.3 (17,13%), PG 5.4 (18,25%), AP 1 (19,07%), PM 2.1 (17,55%) dan PM 3.2 (18,56%). Untuk penelitian lebih lanjut, disarankan membuat profil produksi lipid yang lebih lengkap serta optimasi kadar lipid lebih lanjut pada keenam isolat yang potensial tersebut sehingga dapat memperoleh kadar lipid optimal dan dapat digunakan dalam produksi biodiesel.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih penulis ucapkan kepada Kebun Raya Baturraden dan Kebun Bunga Kaliurang yang telah memberikan izin dalam pengambilan sampel serta kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

Pustaka

- Amir A, SedikMZ, Morsy E. 2015 – Yeasts as a promising tool for microbial oil production. Middle East Journal of Agriculture Research 4(2), 225–226.
- Andriani RD, Akeprathumchai S, Laoteng K, Poomputsa K, Mekvichitsaeng P. 2013 – Pemanfaatan limbah buah nanas sebagai media pertumbuhan *Xanthophyllomyces dendrorhous* untuk produksi lipid. Jurnal Teknologi Pertanian 14(3), 193–200.
- Bayazit AA. 2014 – Fungal lipids: the biochemistry of lipid accumulation. International Journal of Chemical Engineering and Applications 5(5), 409–412.
- Beopoulos A, Nicaud JM. 2012 – Yeast: anew oil producer?oléagineux, corps gras. Lipides 19(1), 22–28.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959 – A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37(8), 911–917.
- Bonturi N, Matsakas L, Nilsson R, Christakopoulos P, MirandaEA, Berglund KA, RovaU. 2015 – Single cell oil producing yeast *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. Journal of Energies 8(1), 5041–5042.

- Botham PA, Ratledge C. 1979 – A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. *Journal of General Microbiology* 114, 361–362.
- Brown BD, Hsu KH, Hammond EG, Glatz BA. 1989 – A relationship between growth and lipid accumulation in *Candida curvata* D. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68(5), 344–352.
- Carere CR, Sparling R, Cicek N, Levin DB. 2008 – Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *International Journal of Molecular Sciences* 9(7), 1343–1360.
- Deak T. 2008 – Handbook of food spoilage by yeast. CRC Press, USA.
- Dyer JM, Chapital DC, Kuan JW, Mullen RT, Pepperman AB. 2002 – Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of novel lipid compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 224–230.
- Evans CT, Colin R, Sarah CG. 1985 – A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. *Journal of Microbiology Methods* 4(1), 204–205.
- Fenina S. 2012 – Kemampuan antagonisme khamir filum Basidiomycota dari tanaman saeh (*Broussonetia papyrifera* Vent.) asal Trowulan terhadap *Aspergillus* spp. UICC. Skripsi, Universitas Indonesia.
- Gandjar I, Sjamsuridzal W, Oetari A. 2006 – Mikologi dasar dan terapan. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Hamamoto M, Takahiko T, Tamura M. 2002 – Systematic study of basidiomycetous yeasts evaluation of the ITS regions of rDNA to delimit species of the genus *Rhodospiridium*. *FEMS Yeast Research* 2(1), 409–413.
- Hogg S. 2005 – Essential microbiology. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex.
- Jiru TM, Abate D, Kiggundu N, Pohl C, Groenewald M. 2016 – Oleaginous yeast from Ethiopia. *AMB Express* 6(1), 78–88.
- Kahr H, Pointner M, Krennhuber K, Wallner B, Jager A. 2015 – Lipid production from diverse oleaginous yeast from steam exploded corn cobs. *Agronomy Research* 13(2), 318–319.
- Kanti A, Sukara E, Latifah K, Sukarno N, Boundy MK. 2013 – Indonesia oleaginous yeasts isolated from *Piper betle* and *P. nigrum*. *Mycosphere* 4 (5), 1015–1026.
- Kolouchova I, Matátkova O, Sigler K, Masak J, Rezanka T. 2016 – Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiologica* 61(5), 431–438.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. 2006 – The yeast a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam.
- Lee JLL, Chen WWN. 2016 – The production, regulation, and extraction of carotenoids from *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 10, 215 doi:10.4172/1747-0862.1000215.
- Liang MH, Jiang JG. 2013 – Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Journal Lipid Research* 52(1), 395–408.
- Mago N, Khuller GK. 1990 – Lipids of *Candida albicans*: subcellular distribution and biosynthesis. *Journal of General Microbiology* 136, 993–996.
- Man C, Reuter WM. 2015 – Analysis of sugars in honey using the Perkinelmer Altus HPLC System with RID detection. Perkinelmer Inc., USA.
- Morita T, Ogura Y, Takashima M, Hirose N, Fukuoka T, Imura T, Kondo Y, Kitamoto D. 2011 – Isolation of *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112(2), 137–144.
- Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK. 2010 – Production of first and second generation biofuels. *Journal Renewable and Sustainable Energy* 14(1), 579–580.

- Nelson DL, Cox MM. 2010 – Principles of biochemistry. Lehninger, USA.
- Patel R, Dadida C, Sarker K, Sen DJ. 2015 – Sudan dyes as lipid soluble aryl-azo naphthols for microbial staining. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 2(3), 417–419.
- Perret M, Chautems A, Spichiger R, Peixoto M, Savolainen V. 2001 – Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Annals of Botany* 87(2), 267–273.
- Saono S, Gandjar I, Basuki T, Karsono H. 1974 – Mycoflora of “Ragi” and some other traditional fermented foods of Indonesia. *Ann. Bogor* 5, 187–196.
- Schneider R. 2004 – Genetics, molecular and cell biology of yeast. Universite De Fribourg Suisse, Swiss.
- Widiastutik N, Alami NH. 2013 – Isolasi dan identifikasi yeast dari rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 3(1), E-11–E-16.
- Valerio E, Gadanho M, Sampaio JP. 2002 – *Sporobolomyces odoratus* sp. nov., a new species in the *Sporidiobolus ruineniae* clade. *FEMS Yeast Research* 2(1), 9–16.